

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

|  |  |
|--|--|
| <b>Date of mailing (day/month/year)</b><br>30 March 2000 (30.03.00)          | <b>Applicant's or agent's file reference</b><br>MOA-004PCT         |
| <b>International application No.</b><br>PCT/JP99/03551                       | <b>Priority date (day/month/year)</b><br>18 August 1998 (18.08.98) |
| <b>International filing date (day/month/year)</b><br>01 July 1999 (01.07.99) |  |
| <b>Applicant</b><br>TAKAHASHI, Hideaki et al                                 |  |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
18 February 2000 (18.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|  |  |
|--|--|
| <p>The International Bureau of WIPO<br/>34, chemin des Colombettes<br/>1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p> | <p>Authorized officer<br/>Diana Nissen</p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p> |
|--|--|



P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 11 DEC 2000

WIPO PCT

|   |   |                         |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 MOA-004PCT                            | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/<br>IPEA/416）を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/J P 99/03551                              | 国際出願日<br>(日.月.年) 01.07.99                             | 優先日<br>(日.月.年) 18.08.98 |
| 国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N 15/10, C12Q 1/68 |   |                         |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>農林水産省農業生物資源研究所長が代表する日本国                 |   |                         |

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で                      ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

|   |                              |          |
|---|------------------------------|----------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日<br>18.02.00                                      | 国際予備審査報告を作成した日<br>14.11.00   |          |
| 名称及びあて先<br>日本国特許庁 (IPEA/J P)<br>郵便番号100-8915<br>東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員)<br><br>加藤 浩 | 4 B 9050 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3448   |                              |          |



-----

## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
|                                     |         |        |                      |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

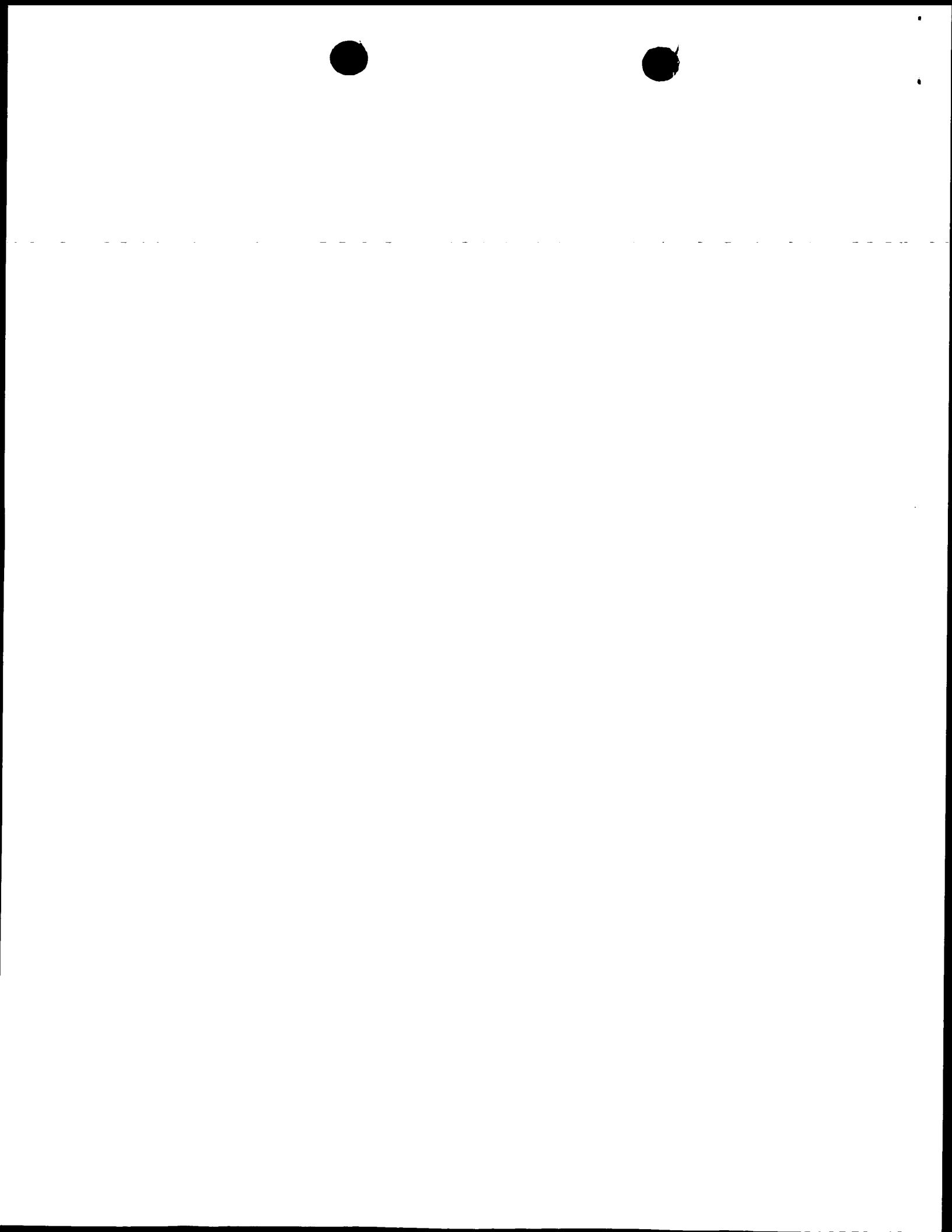
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならないが、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-9 有  
請求の範囲 無

進歩性 (IS)

請求の範囲 1-9 有  
請求の範囲 無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲 1-9 有  
請求の範囲 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-9 に記載された発明は国際調査報告に表示された文献及び当該発明に関連があると認められる文献に記載されておらず、かつ、それらの文献の記載を組み合わせるにより当業者にとって容易に発明できたものでもない。







## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

|  |   |                         |
|--|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 MOA-004PCT           | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 |                         |
| 国際出願番号<br>PCT/JP99/03551               | 国際出願日<br>(日.月.年) 01.07.99                           | 優先日<br>(日.月.年) 18.08.98 |
| 出願人(氏名又は名称)<br>農林水産省農業生物資源研究所長が代表する日本国 |   |                         |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>8</sup> C12N 15/10, C12Q 1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>8</sup> C12N 15/10, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | J. Brown et al.<br>"A simple method for rapid isolation of microsatellites<br>form yeast artificial chromosomes",<br>Molecular and Cellular Probes (1995), Vol.9 No.1, P.53-58 | 1-9              |
| A               | Takahasi H. et al.<br>"An efficient method to clone chicken microsatellite repeat<br>sequences",<br>日本家禽学会誌 (1996), Vol.33 No.5, P.292-299                                     | 1-9              |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.07.99

国際調査報告の発送日

10.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | 高橋 秀彰<br>「家畜・家禽における遺伝子マーカーに関する研究」,<br>農業生物資源研究所研究報告 (1998-Mar.) , No. 12, P. 13-54                       | 1 - 9            |
| A                     | 高橋 秀彰 他<br>「動物遺伝資源の特性評価のためのマイクロサテライトDNAの効<br>率的単離法」,<br>生物資源研究成果情報 (1995) , No. 5, P. 3-4                | 1 - 9            |
| A                     | 高橋 秀彰 他<br>「動物遺伝資源の特性評価のためのマイクロサテライトDNAの効<br>率的単離法 (農業水産省畜産試験場S)」,<br>畜産研究成果情報 (1996) , No. 10, P. 49-50 | 1 - 9            |



## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

|   |   |   |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference<br>MOA-004PCT   | <b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |   |
| International application No.<br>PCT/JP99/03551   | International filing date (day/month/year)<br>01 July 1999 (01.07.99)   | Priority date (day/month/year)<br>18 August 1998 (18.08.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br>C12N 15/10, C12Q 1/68   |   |   |
| Applicant<br>JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL RESOURCES |   |   |

- This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
- This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.  
  
☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

- This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

|   |  |
|---|--|
| Date of submission of the demand<br>18 February 2000 (18.02.00) | Date of completion of this report<br>14 November 2000 (14.11.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP                         | Authorized officer   |
| Facsimile No.   | Telephone No.  |





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03551

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03551

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

|                               |        |     |     |
|-------------------------------|--------|-----|-----|
| Novelty (N)                   | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |
| Inventive step (IS)           | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-9 | YES |
|                               | Claims |     | NO  |

### 2. Citations and explanations

The subject matters of claims 1-9 are neither described in any of the documents cited in the ISR and the documents considered to relate to the present invention, nor could have been easily invented by a person skilled in the art by combining the descriptions of those documents.



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) 国際特許分類6</b><br>C12N 15/10, C12Q 1/68  | <b>A1</b> | <b>(11) 国際公開番号</b><br>WO00/11156<br><br><b>(43) 国際公開日</b><br>2000年3月2日 (02.03.00)   |
| <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP99/03551<br><br><b>(22) 国際出願日</b><br>1999年7月1日 (07.07.99)<br><i>18 Feb 01 Borne</i><br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平10/232153<br>1998年8月18日 (18.08.98) JP<br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>農林水産省農業生物資源研究所長が代表する日本国<br>(JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF MINISTRY<br>OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES NATIONAL<br>INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL RESOURCES)[JP/JP]<br>〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2 Ibaraki, (JP)<br><br><b>(72) 発明者 ; および</b><br><b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b><br>高橋秀彰(TAKAHASHI, Hideaki)[JP/JP]<br>〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2<br>農林水産省農業生物資源研究所内 Ibaraki, (JP)<br>關野正志(SEKINO, Masashi)[JP/JP]<br>〒314-0421 茨城県鹿島郡波崎町海老台<br>水産庁水産工学研究所内 Ibaraki, (JP) |           | <b>(74) 代理人</b><br>弁理士 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.)<br>〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階<br>Ibaraki, (JP)<br><br><b>(81) 指定国</b> AU, CA, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE,<br>DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)<br><br>添付公開書類<br>国際調査報告書 |
| <b>(54) Title: METHOD FOR ISOLATING SATELLITE SEQUENCE</b><br><br><b>(54) 発明の名称</b> サテライト配列の単離方法<br><br><b>(57) Abstract</b><br>A library having an elevated homogeneity is obtained by cleaving a genomic DNA by a method not depending on base sequences, for example, ultrasonication. By selecting a satellite sequence from this library, the isolation efficiency can be elevated. Thus, a microsatellite sequence useful as a DNA marker can be efficiently isolated.  |           |   |

ゲノムDNAの切断を超音波処理等の塩基配列に依存しない切断方法に基づいて行うことにより、より均質なライブラリーを得る。このライブラリーからサテライト配列を選択することによって、単離効率が向上する。DNAマーカーとして有用なマイクロサテライト配列を効率的に単離することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

|    |              |    |         |    |                |    |            |
|----|--------------|----|---------|----|----------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦     | DM | ドミニカ    | KZ | カザフスタン         | RU | ロシア        |
| AL | アルバニア        | EE | エストニア   | LC | セントルシア         | SD | スーダン       |
| AM | アルメニア        | ES | スペイン    | LI | リヒテンシュタイン      | SE | スウェーデン     |
| AT | オーストリア       | FI | フィンランド  | LK | スリ・ランカ         | SG | シンガポール     |
| AU | オーストラリア      | FR | フランス    | LR | リベリア           | SI | スロヴェニア     |
| AZ | アゼルバイジャン     | GA | ガボン     | LS | レソト            | SK | スロヴァキア     |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国      | LT | リトアニア          | SL | シエラ・レオネ    |
| BB | バルバドス        | GD | グレナダ    | LU | ルクセンブルグ        | SN | セネガル       |
| BE | ベルギー         | GE | グルジア    | LV | ラトヴィア          | SZ | スワジランド     |
| BG | ブルガリア        | GH | ガーナ     | MA | モロッコ           | TD | チャード       |
| BF | ブルキナ・ファソ     | GM | ガンビア    | MC | モナコ            | TG | トーゴ        |
| BH | バーレーン        | GN | ギニア     | MD | モルドヴァ          | TJ | タジキスタン     |
| BJ | ブルンジ         | GW | ギニア・ビサオ | MG | マダガスカル         | TZ | タンザニア      |
| BY | ベラルーシ        | GR | ギリシャ    | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TM | トルクメニスタン   |
| CA | カナダ          | HR | クロアチア   |    | 共和国            | TR | トルコ        |
| CF | 中央アフリカ       | HU | ハンガリー   | ML | マリ             | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ          | ID | インドネシア  | MN | モンゴル           | UA | ウクライナ      |
| CH | スイス          | IE | アイルランド  | MR | モーリタニア         | UG | ウガンダ       |
| CI | コートジボアール     | IL | イスラエル   | MW | マラウイ           | US | 米国         |
| CM | カメルーン        | IN | インド     | MX | メキシコ           | UZ | ウズベキスタン    |
| CN | 中国           | IS | アイスランド  | NE | ニジェール          | VN | ヴェトナム      |
| CR | コスタ・リカ       | IT | イタリア    | NL | オランダ           | YU | ユーゴスラビア    |
| CY | キプロス         | JP | 日本      | NO | ノルウェー          | ZA | 南アフリカ共和国   |
| CZ | チェッコ         | KE | ケニア     | NZ | ニュージーランド       | ZW | ジンバブエ      |
| DE | ドイツ          | KG | キルギスタン  | PL | ポーランド          |    |            |
| DK | デンマーク        | KP | 北朝鮮     | PT | ポルトガル          |    |            |
|    |              | KR | 韓国      | RO | ルーマニア          |    |            |

## 明細書

### サテライト配列の単離方法

#### 産業上の利用分野

本発明は、サテライト配列の単離方法に関する。集団遺伝マーカーとして有用なサテライト配列は、遺伝連鎖解析等のマーカーとなる。したがって、その効率的な単離技術は、ゲノム解析における重要な研究課題である。

#### 背景技術

真核生物のゲノムには、類似した塩基配列の繰り返りで構成された反復配列の存在が知られていた。最初に発見されたのはサテライトDNAと呼ばれる数百～数千に及ぶ長い配列を1つの繰り返し単位とするものでサテライト配列(Bioscience, 27:790-796, 1977)と呼ばれている。その後、より短い配列で構成された反復配列も確認された。それらは、繰り返し単位の大きさに応じて、2-5塩基の繰り返し単位(Nucleic Acid Res. 9:5931-5947, 1981)を持つマイクロサテライト配列(Am. J. Hum. Genet. 4:397-401, 1989)、そして10-64塩基の繰り返し単位(Nature, 295:31-35, 1982)を持つミニサテライト配列(Nature, 314:67-73, 1985)と名づけられた。マイクロサテライト配列は、シンプルシーケンス(Nucleic Acid Res. 17:6463-6471, 1989)、あるいはショートタンデムリピート(Am. J. Hum. Genet. 49:746-756)などとも呼ばれている。

マイクロサテライト配列は、発見当初はマーカーとしての利用は報告されなかった。しかし、Polymerase Chain Reaction(PCR)によって多型が確認(Am. J. Hum. Genet. 4:397-401, 1989)されてからは、さまざまな分野でマーカーとして注目されるようになった。具体的には、人間や動植物の家系・系統判別や個体識別などへの応用が進んでいる。マイクロサテライト配列はゲノム全体に散在し、しかも変

異に富むことから遺伝マーカーとして優れている。またマイクロサテライトDNA多型は、多型遺伝子座数や1遺伝子座当たりの対立遺伝子数が多い。更にPCRに基づいていることから操作が簡単であること、また増幅産物は電気泳動によって1本、あるいは2本のバンドとして検出されるので型判別が容易で、処理能力にも優れていた。こうしてマイクロサテライトDNAマーカーは、もっとも有効な集団遺伝マーカーとして広く普及した(J.Fish.Biol.,47:29-55,1995)。

マイクロサテライトDNA多型解析を行うには、まず多数のマイクロサテライトDNAを基本的には解析対象である種ごとに単離しておく必要がある。そしてマイクロサテライト多型の検出にあたっては、PCRでマイクロサテライトDNA領域を増幅しなければならない。PCRには、適切なプライマーが必要である。つまり、マイクロサテライトDNA多型解析を行うには、その種のマイクロサテライトDNAの単離と、マイクロサテライト領域を増幅することができるPCR用のプライマーの設計を効率的に行う方法が求められる。

マイクロサテライト多型解析が進んでいない家禽類について、本発明者らは効率的なマイクロサテライトの単離が期待できる方法を既に報告している(Jpn.Poultry.Sci.,33,292-299,1996)。この方法は、それまでマイクロサテライト配列の一般的な単離方法であった、ゲノムの制限酵素による断片化、ベクターへの挿入、(TG)<sub>n</sub>プライマーによる伸長反応、そしてクローニングという一連の操作に基づく方法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,89,3419-1423,1992)を改良したものである。すなわち、形質転換効率の高いベクターの選択、Mung beanヌクレアーゼによる1本鎖DNAの特異的な消化、あるいはDNaseIとRNaseAによる大腸菌由来のDNAやRNAの除去等を行って、未知のマイクロサテライト配列の単離を達成した。ニワトリではマイクロサテライト配列の数が少なく、効率的なマイクロサテライト配列の単離は困難とされている。この方法により、ニワトリのマイクロサテライト配列の単離を試みた公知の方法(Poultry Science,74:1855-1874,1995)に比べ、計算上は6倍効率的な単離を達成することができた。



しかし、この方法を用いても、得られたマイクロサテライトDNAクローンの中には、なお問題を持ったものの混入を避けられなかった。すなわち、クローンの中で重複するものの割合が高く、単に効率性の問題のみならず、偏りを生じている恐れもある。

マイクロサテライト配列は、生物種毎に単離する必要がある。解析に必要なマイクロサテライト配列の単離が進んでいる種は少なく、今後も多くの種からマイクロサテライト配列の単離を行う必要がある。しかし、たとえばニワトリのゲノムにおいてはマイクロサテライト配列の頻度が低いといったような、種に固有の問題点が多い。したがってマイクロサテライト配列の新たな単離技術の提供は、いろいろなアプローチの選択を可能とするという点においても有意義である。

#### 発明の開示

本発明は、単離効率に優れたサテライト配列の単離方法の提供を課題としている。本発明は、公知技術では達成することのできない、高度に効率化された単離方法を提供するものである。

本発明者らは、公知技術によるサテライト配列の単離にあたって、重複クローンが多く生じる主な原因のひとつがゲノムDNAの断片化操作にあるのではないかと考えた。すなわち、制限酵素による切断では、配列特異的な切断が行われるので、ゲノムライブラリーに偏りが生じる可能性を否定できないのである。

そこで本発明者らは、塩基配列に依存しない、よりランダムな切断が期待できる切断方法をゲノムDNAの断片化に採用することを試みた。その結果、塩基配列に依存しないDNA消化酵素や物理的な作用に基づくゲノムDNAの切断が可能なことを見出した。しかし、物理的に切断された大半のゲノムDNA断片はその末端がリン酸化されておらず、ベクターへの酵素的な組み込みを効率的に行うことができない。また、物理的に切断された断片の切断部分は不規則に一方の鎖が突出した状態にあるため、ライゲーションもできない。本発明者らはこれらの問題点を、いくつ

かの酵素処理によって克服し、より均質なゲノムライブラリーを得る方法を確立した。更にこのライブラリーに基づいてサテライト配列の効率的な単離が可能となることを確認して本発明を完成した。なお本発明においてサテライト配列とは、特に断りの無い場合にはマイクロサテライト配列やミニサテライト配列を含む反復配列全般を意味する。なお本発明において、マイクロサテライト配列とは、2-5bpの、またミニサテライト配列は10-64bpの繰り返し単位からなる繰り返し配列を意味する。すなわち本発明は、以下のサテライト配列の単離方法に関する。

- (1) 次のステップ a) - b) を含むサテライト配列の単離方法であって、塩基配列に依存しない方法に基づいてゲノムDNAを切断するサテライト配列の単離方法。
  - a) ゲノムDNAをランダムに切断した断片を得る工程、および
  - b) 工程 a) で得た断片から、サテライト配列を含む断片を選択する工程、
- (2) 塩基配列に依存しない方法が、物理的な切断方法または酵素的な切断方法である、(1) のサテライト配列の単離方法。
- (3) 物理的な切断方法が超音波処理である、(2) のサテライト配列の単離方法。
- (4) 超音波処理によって断片化されたゲノムDNAの切断面を平滑末端処理する (3) のサテライト配列の単離方法。
- (5) 前記平滑末端処理が、1本鎖特異的エンドヌクレアーゼ、および3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼによるものである、(4) のサテライト配列の単離方法。
- (6) 酵素的な切断方法が、塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼによるものである、(2) のサテライト配列の単離方法。
- (7) 塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼがDNaseIである、(6) のサテライト配列の単離方法。

(8) サテライト配列がマイクロサテライト配列である、(1)のサテライト配列の単離方法。

(9) (1) - (8) のいずれかのサテライト配列の単離方法によって単離されたサテライト配列のDNAマーカーとしての使用

本発明では、塩基配列に依存しないランダムな断片を与える切断方法に基づいてゲノムDNAの切断を行うことが重要な要件である。塩基配列に依存しない方法に基づくゲノムDNAの切断とは、構造的な性質（すなわち塩基配列）に依存せずDNAの切断を行うことを意味する。したがって、塩基配列に依存してDNAを切断する化学的な反応や制限酵素による消化は、本発明における切断方法を構成しない。これらの作用による処理を加えるゲノムDNAは、公知の方法により調製することができる。すなわち、細胞をプロテアーゼで酵素的に分解し、適当な溶媒でDNAを抽出する。

塩基配列に依存しない方法に基づくゲノムDNAの切断には、たとえば物理的な作用に基づく切断や、塩基配列を認識しないDNA消化酵素の作用に基づく切断方法を用いることができる。物理的な作用とは、超音波処理や攪拌等の作用を示すことができる。他方、塩基配列を認識しないDNA消化酵素としては、DNaseIなどが知られている。これらの作用は、いずれも本発明に応用することができる。中でも超音波による処理は、再現性にも優れた望ましい操作のひとつである。超音波処理によれば、簡単な作業によって、短時間で均一な長さの断片を多量に得ることができる。これに対してDNaseIによるゲノムDNAの部分消化では、均一な長さの断片を再現性良く得るには、厳密な条件設定が求められる。また操作性の点においても、煩雑なものとなりやすい。

ゲノムDNAの切断処理の程度は、目的とするサテライト配列に応じたサイズを持つ断片が効率的に得られる条件を経験的に設定すれば良い。たとえばマイクロサテライト配列の単離を目的とする場合には、ライブラリーとして300-900bp、の断片を与える処理条件を選択する。切断断片をベクターにライゲーションする操作

を考慮すると、300-500bp、あるいは500-800bpの断片を多く生成する条件が望ましい。なぜならば、小さい断片の整数倍の大きさを持つ断片を含む場合、断片が互いにライゲーションしたものととの区別ができなくなってしまうからである。超音波処理を例にとると、氷冷下で20kHz振幅10の超音波処理を行う場合、1分間の処理を1-5回程度とすれば300-500bpの断片を効率的に得ることができる。超音波処理を長時間行うと試料の発熱を招き、DNAの変性をもたらす可能性があるので、短時間の処理を繰り返すようにするのが望ましい。

超音波処理等の物理的な作用によって切断したゲノムDNAは、ライゲーション効率が悪く、このままではベクターへの組み込みを能率的に行うことができない。そのため、望ましくは末端の平滑化を行う。本発明においては、公知の平滑化方法を利用することができる。すなわち、1本鎖特異的エンドヌクレアーゼによる突出末端の消化、更にはDNAポリメラーゼを利用して3'陥没末端に相補鎖を合成してより平滑化をより確実に行うことができる。具体的には、1本鎖特異的エンドヌクレアーゼとして、Mung beanヌクレアーゼやS1ヌクレアーゼを利用することができる。一方DNAポリメラーゼとしては、3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を備えたDNAポリメラーゼを利用することができる。このようなDNAポリメラーゼには、T4 DNAポリメラーゼ、pfuポリメラーゼ、あるいはKODポリメラーゼなどを示すことができる。実施例で用いたMung beanヌクレアーゼは1本鎖特異的エンドヌクレアーゼで、DNAの1本鎖部分を消化することによって平滑化を達成する。実施例においては、更にT4DNAポリメラーゼの作用により平滑化を確実に行っている。T4DNAポリメラーゼは、強力な3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を持ち3'突出末端を消化するとともに、3'陥没末端に対しては相補鎖を合成することによって平滑末端を与える。ただT4DNAポリメラーゼは3'陥没末端がリン酸基を持つ場合には平滑化できないので、Mung beanヌクレアーゼの併用が望ましい。このとき、Mung beanヌクレアーゼ処理は末端の平滑化とともに、超音波処理によって生じた2本鎖DNAのギャップ部分を切断する。その結果、目的の長さよりも短い断片を生じてしまう可

能性がある。短い断片を含まないライブラリーを得るには、Mung beanヌクレアーゼ処理の後に目的の長さの断片を分離するステップを設けると良い。アガロース電気泳動やゲルろ過により、目的の長さの断片を分離することができる。平滑末端処理したゲノムDNAの断片は、このままベクターへのライゲーションを行うことができる。あるいは、効率良くライゲーションを行うためにその5'末端をリン酸化することもできる。リン酸化にはT4ポリヌクレオチドキナーゼを利用する。

5'末端をリン酸化したゲノムDNA断片は、ベクターへのライゲーションにあたっては断片同士のライゲーションを起こす。これを避けるために、断片の濃度を低めにする一方、ベクターを過剰量で用いてベクターへのライゲーションの機会を増やすようにすると良い。ライゲーションにはT4DNAリガーゼをライゲーションバッファー中で作用させるが、このときにベクターの切断を行う制限酵素を共存させることによってライゲーションを効率的に進めることができる。たとえばpCR-ScriptSK(+)をベクターとして用いるとき、制限酵素SrfIの共存によりベクターを常に開環した状態に維持することができる。インサートとライゲーションしたベクターにはSrfIは作用しないので、ライゲーション効率の向上が期待できる。

本発明においては、物理的な作用による切断のみならず、塩基配列に依存しないDNA消化酵素による断片化も可能である。このような酵素には、たとえばDNase I等が知られている。DNase Iによる酵素処理にあたっては、ゲノムDNA全体に酵素が均等に作用するような条件を与え、更に期待する大きさの断片を効率的に得ることができる条件を経験的に設定する。たとえば、酵素作用の均一性を維持するためには、核タンパク質を取り除いてゲノムDNAはできるだけ高純度なものを用いるようにすると良い。また、酵素反応は、小さな断片を多量に生じないように迅速な処理を心がける。また、再現性を高度に維持するには、反応時間や温度といった条件も正確に管理する必要がある。酵素反応終了後は、加熱などによって反応を停止し、核酸成分を回収し、更に必要に応じて特定の断片を抽出した後、上記のようなベクターへの組み込みを行う。酵素消化したゲノムDNAの断片は、平滑

末端となっており、リン酸化された状態にあるので、そのままライゲーションに使うことができる。

本発明に用いられるベクターは特に限定されない。具体的には、pCR-ScriptSK(+)、pBluescriptKS(+)(いずれもStratagene社製)やpUC18等の公知のベクターを利用すれば良い。インサートを含むベクターによって適当な宿主を形質転換し、増殖させた後にDNAを回収してゲノムライブラリーとする。pCR-ScriptSK(+ )による形質転換には、大腸菌(コンピテントセル)XLI-Blue MRF'や、XL2-Blue MRF'、あるいはTG1(いずれもStratagene社製)のような形質転換効率に優れたものを利用すると有利である。

こうして構築したゲノムライブラリーをもとに、目的とするサテライト配列を含むものをクローニングする。サテライト配列のスクリーニングは、サテライト配列用のプローブを使ったコロニーハイブリダイゼーション(Can.J.Fish.Biol., 51:1959-1996, 1994)や、プライマーエクステンション(Proc. Natl.Acad.Sci.USA., 89, 3419-1423, 1992)に基づいて行うことができる。コロニーハイブリダイゼーションでは、前記形質転換細胞のコロニーをフィルターに転写し、たとえば(GT) $n$ という繰り返し配列を持ったプローブとハイブリダイズさせる。なお、プローブを構成するオリゴヌクレオチドの塩基配列は、目的とするサテライト配列に応じて適宜設定する。陽性コロニーを分離することにより、サテライト配列を含むクローンの単離を進める。

一方プライマーエクステンションでは、ゲノムライブラリーを1本鎖DNAとして回収する。たとえばpCR-ScriptSK(+ )をベクターとして用いたとき、形質転換した大腸菌にヘルパーファージVCS-M13等を感染させて、組換えファージとしてインサートを1本鎖の形で回収することができる。ファージにパッケージングされたDNAには酵素作用が及ばないので、回収時に大腸菌に由来するRNAやDNAを酵素的に分解することができ、より効率的なクローニングを行うことができる。

ファージから抽出した1本鎖プラスミドDNAにサテライト配列特異プライマーを

アニールさせてDNAポリメラーゼを作用させる。たとえば哺乳類のマイクロサテライト配列においては、(dA-dT)<sub>n</sub>の繰り返し配列が一般的である(全ゲノムDNAの0.3%)。またヒトでは、(dC-dA/dT-dG)<sub>n</sub>、あるいは(dC-dT/dA-dG)<sub>n</sub>といった組み合わせも多く見られる。こういった情報を元に、これらの配列に相補的な塩基配列を持たせれば、サテライト配列にアニールするプライマーを設計することができる。このときプライマーの5'末端は、ライゲーションに備えて予めリン酸化しておく和良好的。マイクロサテライト配列を含むベクターは、この部分でプライマーを得て2本鎖合成が進むが、プライマーがアニールしないベクターは1本鎖のままである。DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の後にライゲーションを行って完全に2本鎖環状化し、Mung beanヌクレアーゼ等によって1本鎖DNAを分解すればサテライト配列を含むベクターが残る。これを回収して再び形質転換し、クローニングを行うことができる。クローニングされたサテライト配列を含むベクターを増殖させ、DNAを回収してその配列を決定すれば、サテライト配列の単離が完了する。

サテライト配列が周辺領域を含む形で単離されれば、PCRのためのプライマーを設計することができる。PCRプライマーの設計は、市販されている塩基配列の解析用ソフトウェアパッケージを利用すると便利である。たとえば以下に述べる実施例においては、プライマー設計ソフトPrimer Premier (Premier Biosoft International製)を利用している。単離されたマイクロサテライト配列やミニサテライト配列は、種内のフィンガープリントマーカーとして、あるいは家系(系統)のマーカーとして有用である。本発明によって得られたサテライト配列が多型を含む場合には、その塩基配列を個体の同定における指標とすることができる。このようなサテライト配列は、フィンガープリントマーカーと呼ばれる。フィンガープリントマーカーとなるサテライト配列は、その個体が両親から受け継いだものであることから、複数の個体の間で保存されているフィンガープリントマーカーを解析することによって、同一家系である可能性を推測することができる。サテライト配列のこのような用途は、家系(あるいは系統)マーカーと呼ばれる。

更に本発明によって得たサテライト配列は、フィンガープリントマーカ―や家系（あるいは系統）マーカ―といった用途に加え、遺伝連鎖解析のマーカ―として利用することができる。本発明においては、これらの用途に代表される何らかの指標として利用されるサテライト配列を、DNAマーカ―と呼ぶ。

### 図面の簡単な説明

図1は、マイクロサテライト配列特異プローブ（ $(CA)_{10}$ オリゴヌクレオチド）によるドットブロットアッセイの結果を示す発色像。

### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

#### （1）クロアワビDNA断片の調製

クロアワビ(*Haliotis discus discus*)DNAの抽出は、足部筋肉からTNES-Urea法(Fisheries Sci., 62, 723-726, 1996)に準じて行った。ただし今回は4M 尿素を使用した。20  $\mu$ g/ml濃度のゲノムDNA溶液550  $\mu$ lを冷却しながら超音波処理して(20 kHz, Amplitude 10、1分間、5回.)、DNAを断片化した。10  $\mu$ g相当の基質DNA、30mM  $H_3COONa$ (pH4.6)、50mM NaCl、1mM  $(CH_3COO)_2Zn$ 、5% グリセロールおよび60unitsのMung bean ヌクレアーゼ（東洋紡績製）を含む52  $\mu$ lの反応液を、37°C、1時間インキュベートして、DNA断片のギャップ部分の切断と末端を平滑化した。1.2% アガロースゲルで電気泳動を行って300-500bp.に当たるDNA断片を回収した。回収した基質DNA、20  $\mu$ M dNTP、50mM Tris/HCl(pH8.5)、7mM  $MgCl_2$ 、15mM  $(NH_4)_2SO_4$ 、10mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM EDTAおよび10unitsのT4 DNA ポリメラーゼ（東洋紡績製）を含む100  $\mu$ lの反応液を、37°C、1時間インキュベートして、DNA断片の突出末端を平滑化した。さらに基質DNA、0.2mMrATP、50mM Tris/HCl(pH7.6)、10mM  $MgCl_2$ 、10mM 2-メルカプトエタノールおよび10unitsのT4 ポリヌクレオチドキナーゼ（東洋紡績製）を含む50  $\mu$ lの反応液を、37°C、1時間インキュベ―



トして、DNA断片5'末端をリン酸化した。

## (2) ゲノムDNA断片のプラスミドベクターへの連結

1 $\mu$ g相当のpCR-Script SK(+)ベクター (Stratagene製)、25mM Tris/Acetate(pH7.6)、100mM KOAc、10mM MgOAc、0.5mM 2-メルカプトエタノール、10 $\mu$ g/ml BSAおよび10unitsの制限酵素SrfI (Stratagene製) を含む10 $\mu$ lの反応液を、37°C、1時間以上インキュベートして、ベクターのSrfIサイトを切断した。調製したベクター溶液と、3 $\mu$ g相当の基質DNA、10unitsのSrfI、0.5mMrATP、66mM Tris/HCl(pH7.6)、6.6mM MgCl<sub>2</sub>、10mM ジチオスレイトールおよび20unitsのT4 DNAリガーゼ (東洋紡績製) を含む50 $\mu$ lの反応液を、24°C、一晩インキュベートしてDNA断片をベクターへ連結した。65°C、15分間加熱処理して、DNAリガーゼを失活させた後、SrfIをさらに10units加え、37°C、1時間インキュベートして、セルフライゲーションしたベクターを消化した。

## (3) 1本鎖DNA(1本鎖DNA)の調製

5本の培養チューブに、XL2-Blue MRF' ultracompetent cells (Epicurian coli ultracompetent cells, Stratagene製)を100 $\mu$ lずつ入れ、各チューブに200ng相当のライゲーションしたベクターを加えて、添付解説書に従って形質転換した。各チューブに900 $\mu$ lのNZY培地(Maniatis:Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.)を加え、37°C、1時間振とう培養した後、アンピシリン (終濃度50 $\mu$ g/ml)を加え、更に37°C、1時間振とう培養して、形質転換された大腸菌を選択した。各チューブに10<sup>10</sup> pfu相当のVCS-M13 helper phageを加え、37°C、20分間静置後、カナマイシン(終濃度70 $\mu$ g/ml)を加えて37°C、1時間振とう培養して、ヘルパーファージが感染した大腸菌を選択した。各培養液をまとめて、アンピシリンおよびカナマイシンを含む100mlのTerrific培地(Maniatis:Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.)に入れ、37°C、14時間振とう培養した。培養したTerrific培地を、0°C、14,000rpmで10分間遠心

して上澄みを回収し、45 $\mu$ mフィルターを用いた濾過を2回行った。常法（村松正實：ラボマニユアル遺伝子工学，第3版，丸善，東京，1996，pp.51-55.）に従ってPEG沈澱を2回行った後、公知の方法（Jpn.Poult.Sci.,33,292.299,1996）に従って大腸菌に由来するDNAとRNAを消化した。この後、PEG沈澱、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、1本鎖DNAを精製した。

#### （4）(CA)<sub>n</sub>陽性プラスミドの選別

(CA)<sub>12</sub>オリゴヌクレオチドを用いてプライマーエクステンションを行い、(TG/CA)リビートを持つDNA断片が挿入されたプラスミドDNAを選別した。3 $\mu$ g相当の1本鎖DNA、0.2mM dNTP、20mM Tris/HCl(pH8.8)、10mM KCl、10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、2mM MgSO<sub>4</sub>、100 $\mu$ g/ml BSA、0.1% Triton X-100および100pmolの(CA)<sub>12</sub>オリゴヌクレオチドを含む98 $\mu$ lの溶液を、72°C、10分間プレヒーティングした。この溶液に5unitsのPfu DNA ポリメラーゼ（Stratagene製）を加え、ミネラルオイルで重層し、72°C、30分間インキュベートした後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行って、生成した二本鎖DNAを回収し、10 $\mu$ lの滅菌水に溶解した。ライゲーションキット（Ligation high、東洋紡績製）を用いて二本鎖DNAを閉環させた後、加熱処理（65°C、15分間）によってDNAリガーゼを失活させた。この溶液と、30mM CH<sub>3</sub>COONa(pH4.6)、50mM NaCl、1mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Zn、5% グリセロールおよび30unitsのMung beanヌクレアーゼを含む100 $\mu$ lの反応液を、37°C、2時間以上インキュベートし、プライマーエクステンションされなかった1本鎖DNAを消化した。フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿によってDNAを回収し、60 $\mu$ lのTE Bufferに溶解した。

回収されたDNA(1本鎖DNA100ng相当)をXL2-Blue MRF' Ultracompetent cellsへ形質転換した後、アンピシリン50 $\mu$ g/mlを含む2 $\times$ YT寒天培地(Maniatis: Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York,1989.)に展開し、37°C、一晚培養した。培養プレート上で、無作為にシングルコロニーをピックアップし、アンピシリン(終濃度50 $\mu$ g/ml)を含む2 $\times$ YT培地(Maniatis: Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd ed.,Cold

Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.) 2ml 中で、37°C、一晩振とう培養した後、常法（ラボマニュアル遺伝子工学, 第3版, 丸善, 東京, 1996, pp. 51-55.）に従って、アルカリ法によるプラスミド抽出を行い、50 $\mu$ l の TE Buffer に溶解した。

精製したプラスミド DNA (1本鎖 DNA 4ng 相当) を 0.5N NaOH でアルカリ変性し、ナイロンメンブレン (No. 1209299, Boehringer Mannheim) に浸透させ、120°C で 30 分間ベークした。(CA)<sub>10</sub> オリゴヌクレオチドを DIG オリゴヌクレオチド標識キット (DIG Oligonucleotide Tailing Kit, Boehringer Mannheim, 商品名) でジゴキシゲニン標識したプローブと、DIG 核酸検出キット (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Boehringer Mannheim) を使用して、指示書にしたがって (CA)<sub>n</sub> 陽性クローンの検出を行った。結果の一部を図 1 に示した。

#### (5) サイクルシーケンス

(CA)<sub>n</sub> 陽性クローンについて、サイクルシーケンス法を用いて、塩基配列を決定した。シーケンス反応には、5' 末端を Cy5 ラベルした KS プライマーおよび Reverse primer とシーケンスキット (ThermoSequence fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, Amersham) を使用し、シーケンスには蛍光 DNA シーケンサー (ALFexpress, Pharmacia) を使用した。得られた塩基配列のデータから、プライマー設計ソフト (Primer Premier, Premier Biosoft International 製) によって、CA リピートを挟む領域で、最適なプライマーを設計した。以下に、単離したクロアワビのマイクロサテライト配列の塩基配列を示す。なお繰り返し単位がわかりやすいように、繰り返し単位を ( ) でまとめて記載した。実際の塩基配列は配列表に記載したとおりである (番号が配列番号に対応する)。1-24 までの領域については、全て PCR のためのプライマーの設計が可能であり、このうち 9 の領域 (1, 3, 8, 10, 13, 15, 16, 19, 24) については多型を確認することができた。

#### 1. (CA)<sub>41</sub>

2.  $(GACT)_2(CTCA)_7(CA)_2CT(CA)_9$
3.  $C_5CAC_2(CA)_{12}TA(CA)_8$
4.  $(CA)_7$
5.  $(CA)_{16}$
6.  $(GA)_2CAGA(CA)_5$
7.  $CA_3GA_2C_3A_3(CA)_5$
8.  $(CGCA)_9TGCAC_2(CA)_2$
9.  $(CT)_3(CA_2)_3(CA)_5$
10.  $(CA)_{25}$
11.  $CACT(CA)_{16}TACA$
12.  $CA_3(CA)_2T(CA)_4$
13.  $(CA)_{30}$
14.  $CA_2GCA_2C(CA)_{25}$
15.  $(CA)_2CT(CA)_{13}(CGCA)_{11}(CA)_6$
16.  $(CA)_8(CG)_4$
17.  $(CA)_6(CG)_4$
18.  $(CA)_5$
19.  $(CA)_{26}$
20.  $TACATA(CA)_{12}$
21.  $(CA)_2CA_3(CA)_6$
22.  $(CA)_2AC(CA)_3AC(CAC)_2(CA)_5$
23.  $(CA)_8(TGCA)_2$
24.  $(CA)_{34}$
25.  $(CA)_7(CGCA)_2CGA_2(CGCA)_2A_2(CA)_2(CG)_2$
26.  $(CA)_8$
27.  $CAC_8(CA)_9C_4$

28. (CA)<sub>6</sub>(GA)<sub>2</sub>

29. (CA)<sub>26</sub>

30. (CA)<sub>25</sub>

31. CAG(CA)<sub>5</sub>TACA

32. (CA<sub>3</sub>)<sub>3</sub>(CA)<sub>4</sub>CA<sub>3</sub>(CA)<sub>12</sub>G<sub>2</sub>CA(CG<sub>2</sub>)<sub>3</sub>

超音波を使って配列に依存しない切断方法に基づいて作製した(TG/CA)<sub>n</sub>濃縮ライブラリー（48クローン）のうち、約85%（41クローン）が(CA)<sub>n</sub>陽性クローンであった（図1）。このうち、無作為に選んだ32個の(CA)<sub>n</sub>陽性クローンのシーケンスを行った結果、24クローン（72%）でPCRプライマーの設計が可能であった。残りの9クローンでは、リピート領域がベクターとの連結点に隣接していること、リピートの途中でベクターと連結していること、あるいはDNA断片中にリピートが散在していることなどから、プライマーの設計は不可能であった。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、マイクロサテライト配列をはじめとするサテライト配列を効率的に単離することができる。本発明はゲノムDNAの断片化に塩基配列に依存しない切断方法を利用するので、塩基配列による影響を受けず、偏りの無いライブラリーを得ることができる。偏りの無いライブラリーから単離されたサテライト配列には重複が少なく、効率的な単離を行えるのである。

たとえばこれまでマイクロサテライト配列が単離されていなかったクロアウビにおいて、1度の操作で32クローンからなる(TG/CA)<sub>n</sub>濃縮ライブラリーを実現した。このライブラリーから得られたクローンには重複が無く、本発明者らがニワトリで試みた方法で重複が多かったことと比較すると、高度に効率化されているといえることができる。単に重複が少ないことのみならず、単離されるクローンがPCR用のプライマーを設計しうるものであることも特筆すべき効果である。たとえば実施例に示した例では、計算上培養プレート上の60%以上（ $0.85 \times 24/32$ ）の

クローンからPCR用プライマーの設計が可能である。これらの成績により、本発明に基づくマイクロサテライト配列の単離方法は、汎用性を備えた優れた方法であることが明らかである。

更に本発明によって単離されたサテライト配列は、フィンガープリントマーカ一、家系（あるいは系統）マーカ一、そして遺伝連鎖解析のマーカ一等のDNAマーカ一として利用することができる。

## 請求の範囲

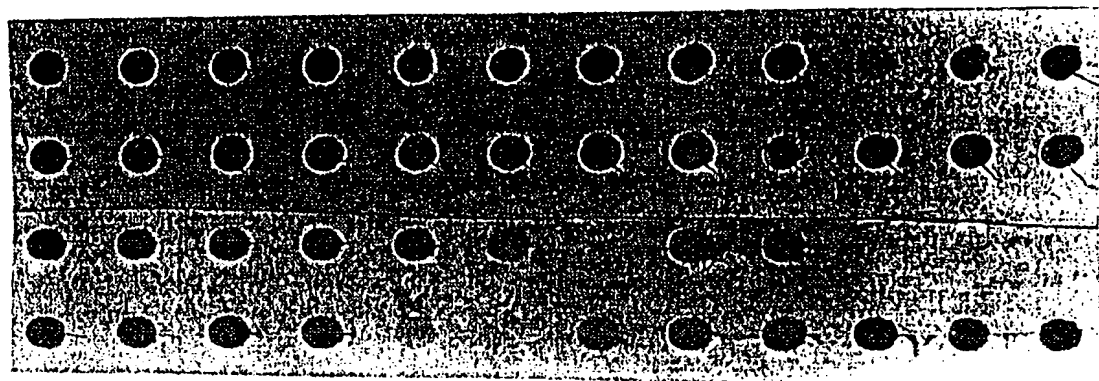
1. 次のステップ a) - b) を含むサテライト配列の単離方法であって、塩基配列に依存しない方法に基づいてゲノムDNAを切断するサテライト配列の単離方法。
  - a) ゲノムDNAをランダムに切断した断片を得る工程、および
  - b) 工程 a) で得た断片から、サテライト配列を含む断片を選択する工程、
2. 塩基配列に依存しない方法が、物理的な切断方法または酵素的な切断方法である、請求項 1 のサテライト配列の単離方法。
3. 物理的な切断方法が超音波処理である、請求項 2 のサテライト配列の単離方法。
4. 超音波処理によって断片化されたゲノムDNAの切断面を平滑末端処理する請求項 3 のサテライト配列の単離方法。
5. 前記平滑末端処理が、1 本鎖特異的エンドヌクレアーゼ、および3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を持つDNAポリメラーゼによるものである、請求項 4 のサテライト配列の単離方法。
6. 酵素的な切断方法が、塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼによるものである、請求項 2 のサテライト配列の単離方法。
7. 塩基配列に依存しないエンドヌクレアーゼがDNaseIである、請求項 6 のサテライト配列の単離方法。
8. サテライト配列がマイクロサテライト配列である、請求項 1 のサテライト配列の単離方法。
9. 請求項 1 - 8 のいずれかのサテライト配列の単離方法によって単離されたサテライト配列のDNAマーカーとしての使用。





1 / 1

☒ 1





## 配列表

## SEQUENCE LISTING

<110> National Research Institute of Agrobiological Resources

農林水産省農業生物資源研究所

<120> Methods for Isolation of satellite Sequence.

サテライト配列の単離方法

<130> microsatellite

<140>

<141>

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 82

<212> DNA

<213> Halotis discus discus

<400> 1

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60



cacacacaca cacacacaca ca

82

<210> 2

<211> 60

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 2

gactgactct cactcactca ctactcact cactcacaca ctacacacaca cacacacaca 60

<210> 3

<211> 51

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 3

ccccccaccc acacacacac acacacacac acatacacac acacacacac a

51

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 4

cacacacaca caca

14



<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 5

cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca

32

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 6

gagacagaca cacacaca

18

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 7

caaagaaccc aaacacacac aca

23

<210> 8

<211> 46



-----



<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 8

cgcacgcacg cacgcacgca cgcacgcacg cacgcatgca cccaca

46

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 9

ctctctcaac aacaacacac acaca

25

<210> 10

<211> 50

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 10

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca

50

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus



<400> 11

cactcacaca cacacacaca cacacacaca cacacataca

40

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 12

caaacacatc acacaca

17

<210> 13

<211> 60

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 13

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus



<400> 14

caagcaacca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacaca 58

<210> 15

<211> 88

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 15

cacactcaca cacacacaca cacacacaca cagcagcga cgcagcagc cagcagcga 60  
cgcagcagc cagcacaca cacacaca 88

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 16

cacacacaca cacacagcg cgcg 24

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 17



cacacacaca cacgcgcgcg

20

<210> 18

<211> 10

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 18

cacacacaca

10

<210> 19

<211> 52

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 19

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca

52

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 20

tacatacaca cacacacaca cacacacaca

30





<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 21

cacacaaaca cacacacaca

20

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 22

cacaaccaca caaccaccac cacacacaca

30

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

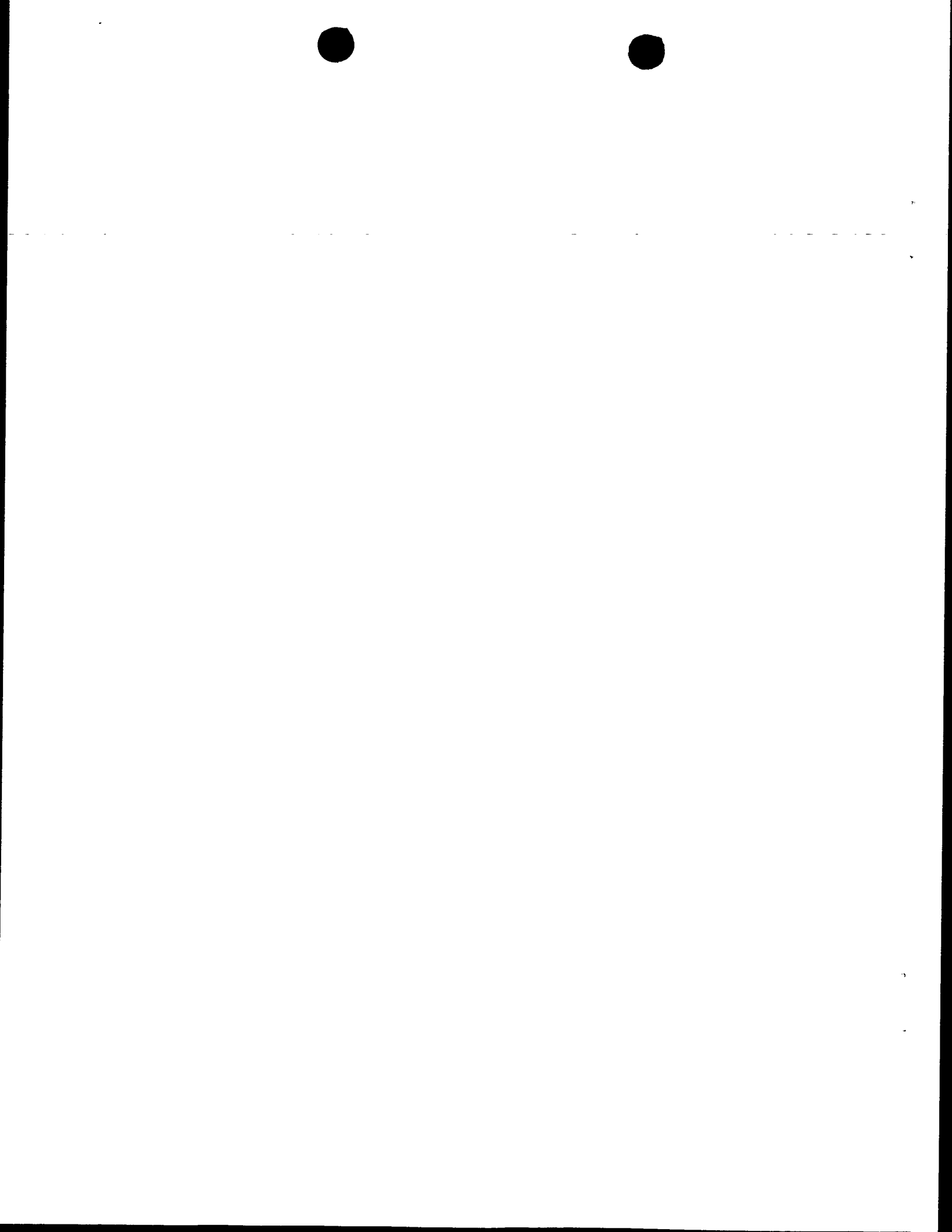
<400> 23

cacacacaca cacacatgca tgca

24

<210> 24

<211> 68



<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 24

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca 60

cacacaca

68

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 25

cacacacaca cacacgcacg cacgaacgca cgcaaacaca cgcg

44

<210> 26

<211> 16

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 26

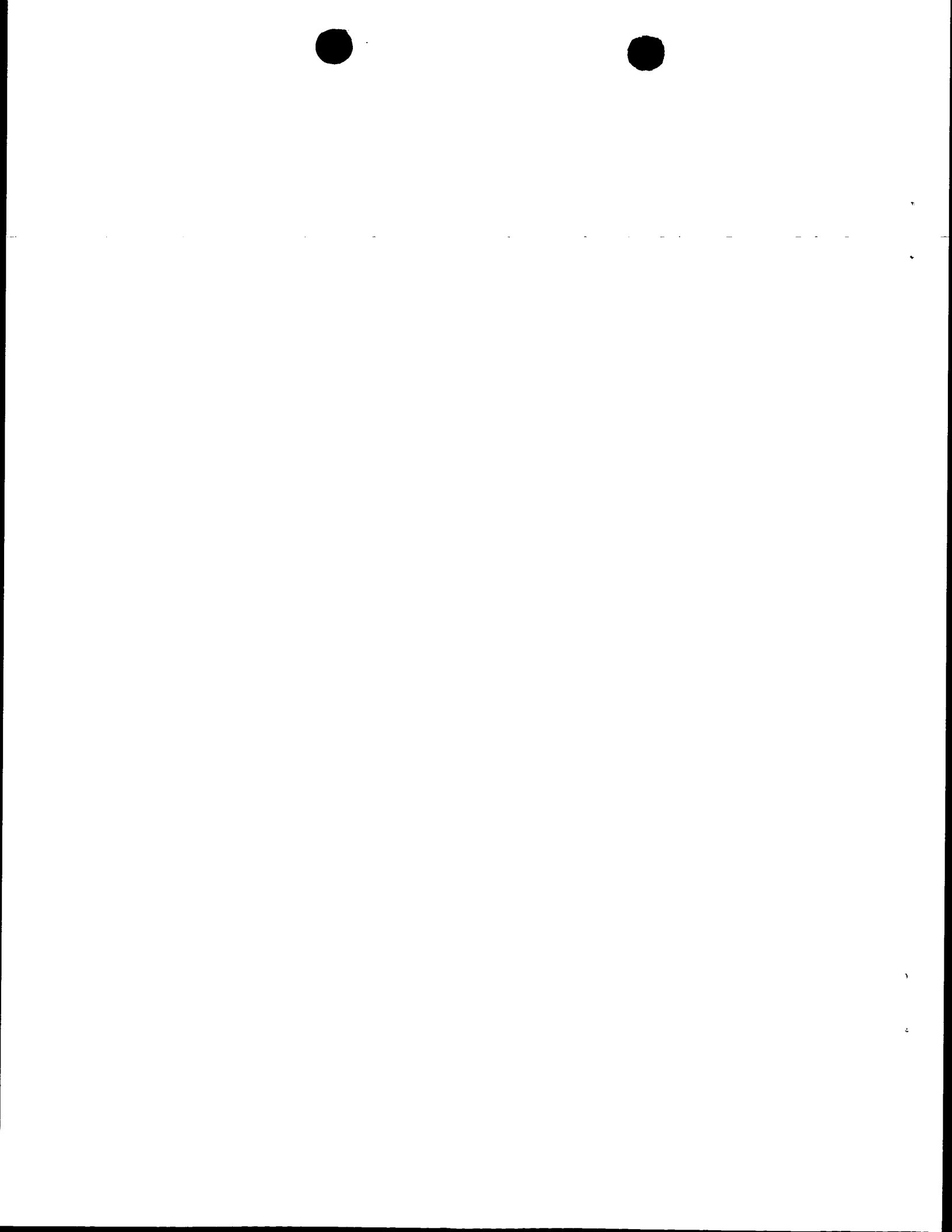
cacacacaca cacaca

16

<210> 27

<211> 32

<212> DNA



<213> Haliotis discus discus

<400> 27

cacccccccc cacacacaca cacacacacc cc

32

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 28

cacacacaca cagaga

16

<210> 29

<211> 52

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 29

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ca

52

<210> 30

<211> 50

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus



<400> 30

cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaca

50

<210> 31

<211> 17

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 31

cagcacacac acataca

17

<210> 32

<211> 55

<212> DNA

<213> Haliotis discus discus

<400> 32

caaacaaca aacacacaca caaacacaca cacacacaca cacacacagg cacggcggcg 60

g

61



1

2

3

4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03551

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/10, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/10, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JICST File (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | J. Brown et al., "A simple method for rapid isolation of microsatellites from yeast artificial chromosomes", Molecular and Cellular Probes (1995), Vol. 9 No. 1, P.53-58                | 1-9                   |
| A         | Takahashi H. et al., "An efficient method to clone chicken microsatellite repeat sequences", Japanese Poultry Science (1996), Vol. 33 No. 5, P.292-299                                  | 1-9                   |
| A         | Hideaki Takahashi "Kachiku kakin ni okeru idenshi marker ni kansuru kenkyuu", Nougyou Seibutsu Shigen Kenkyuusho Kenkyuu Houkoku, (1998-Mar.), No. 12, P.13-54                          | 1-9                   |
| A         | Hideaki Takahashi, et al., "Doubutsu iden shigen no tokusei hyouka no tame no micro satellite DNA no kouritsuteki tanrihou", Seibutsu Shigen Kenkyuu Seika Jouhou, (1995), No. 5, P.3-4 | 1-9                   |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

Date of the actual completion of the international search  
28 July, 1999 (28. 07. 99)Date of mailing of the international search report  
10 August, 1999 (10. 08. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03551

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | Hideaki Takahashi, et al., "Doubutsu iden shigen no tokusei hyouka no tame no micro satellite DNA no kouritsuteki tanrihou (Nougyou Suisanshou Shikenjou S)", Chikusan Kenkyuu Seika Jouhou (1996), No. 10, P.49-50 | 1-9                   |

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/03551

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/10, C12Q 1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/10, C12Q 1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | J. Brown et al.<br>"A simple method for rapid isolation of microsatellites<br>from yeast artificial chromosomes",<br>Molecular and Cellular Probes (1995), Vol.9 No.1, P.53-58 | 1-9              |
| A               | Takahasi H. et al.<br>"An efficient method to clone chicken microsatellite repeat<br>sequences",<br>日本家禽学会誌 (1996), Vol.33 No.5, P.292-299                                     | 1-9              |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.07.99

国際調査報告の発送日

10.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) 関連すると認められる文献 |   |                  |
|---------------------|---|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリ*      | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                   | 高橋 秀彰<br>「家畜・家禽における遺伝子マーカーに関する研究」,<br>農業生物資源研究所研究報告 (1998-Mar.), No. 12, P. 13-54                       | 1 - 9            |
| A                   | 高橋 秀彰 他<br>「動物遺伝資源の特性評価のためのマイクロサテライトDNAの効<br>率的単離法」,<br>生物資源研究成果情報 (1995), No. 5, P. 3-4                | 1 - 9            |
| A                   | 高橋 秀彰 他<br>「動物遺伝資源の特性評価のためのマイクロサテライトDNAの効<br>率的単離法 (農業水産省畜産試験場S)」,<br>畜産研究成果情報 (1996), No. 10, P. 49-50 | 1 - 9            |